



Puree buah



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu.....	1
6 Pengambilan contoh	3
7 Cara uji	3
8 Syarat lulus uji.....	4
9 Higiene.....	4
10 Pengemasan.....	4
11 Syarat penandaan	4
Lampiran A (normatif) Cara uji puree buah	5
Bibliografi.....	41

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Puree buah* ini merupakan SNI baru. Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri olahan buah.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No.24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 00.06.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-04-S1, Minuman dan Tembakau Kementerian Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 7 Maret 2012 di Bogor. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 13 Juli 2012 sampai dengan tanggal 12 Oktober 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Puree buah

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji puree buah.

2 Acuan normatif

Untuk acuan normatif tidak bertanggal, edisi terakhir yang digunakan (termasuk revisi dan amandemennya).

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

puree buah

produk buah yang diperoleh dari buah segar atau buah yang didinginkan atau dibekukan dengan kematangan yang cukup yang dihancurkan tanpa mengekstrak sari buahnya dengan atau tanpa bahan tambahan pangan yang diizinkan

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

buah segar atau buah yang didinginkan atau dibekukan

4.2 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk puree buah sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu puree buah sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu puree buah

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	khas, normal
1.2	Rasa	-	khas, normal
1.3	Warna	-	khas, normal

Tabel 1 – (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
2	Padatan terlarut	° Brix	sesuai Tabel 2
3	Keasaman	g asam/100 mL	sesuai Tabel 2
4	Cemaran logam		
4.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,2
4.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
4.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0/ maks. 250*
4.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
5	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,1
6	Cemaran mikroba		
6.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1×10^4
6.2	<i>Coliform</i>	koloni/g	maks. 20
6.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
6.4	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif / 25 g
6.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	negatif/g
6.6	Kapang dan khamir	koloni/g	maks. 1×10^2
CATATAN: * untuk produk pangan yang diolah dengan proses panas dan dikemas dalam kaleng			

Tabel 2 – Padatan terlarut (° Brix) dan keasaman untuk puree buah

No	Jenis buah	Padatan terlarut (° Brix)	Keasaman (g asam sitrat/100 mL)
1	Mangga Gedong (<i>Mangifera indica</i> var. Gedong)	Min. 13,0	Min. 0,22
2	Mangga Harum Manis (<i>Mangifera indica</i> var. Arum manis)	Min. 13,0	Min. 0,87
3	Mangga Alphonso (<i>Mangifera indica</i> var. Alphonso)	Min. 15,0	Min. 0,45
4	Mangga Totapuri (<i>Mangifera indica</i> var. Totapuri)	Min. 14,0	Min. 0,50
5	Sirsak (<i>Annona muricata</i> L.)	Min. 12,0	Min. 0,87
6	Jambu Biji Merah (<i>Psidium guajava</i> var. Pink Guava)	Min. 7,5	Min. 0,50

Tabel 2 – (lanjutan)

No	Jenis buah	Padatan terlarut (° Brix)	Keasaman (g asam sitrat/100 mL)
7	Jambu Biji Putih (<i>Psidium guajava</i> var. White Guava)	Min. 9,0	Min. 0,50
8	Pisang (<i>Musa acuminata</i>)	Min. 20,0	Min. 0,35
9	Stroberi (<i>Fragaria virginiana</i>)	Min. 7,0	Min. 0,12
10	Markisa (<i>Passiflora flavicarva</i>)	Min. 15,0	Min. 3,67
11	Nanas (<i>Ananas comosus</i>)	Min. 13,0	Min. 0,50
12	Apel (<i>Pyrus malus</i>)	Min. 13,0	Min. 0,30*)
13	Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Min. 15,0	Min. 1,00
14	Asam Jawa (<i>Tamarindus indica</i>)	Min. 16,0	Min. 3,00**)
15	Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>)	Min. 7,0	Min. 0,60
Catatan: *) sebagai asam malat **) sebagai asam tartarat			

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk puree buah seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- Cara uji padatan terlarut sesuai Lampiran A.3
- Cara uji keasaman sesuai lampiran A.4
- Cemaran logam sesuai Lampiran A.5
 - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.5.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.5.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.5.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.6
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.7
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji Angka Lempeng Total sesuai Lampiran A.7.2
 - Cara uji *Coliform* sesuai Lampiran A.7.3
 - Cara uji *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.7.4
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.7.5
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.7.6
 - Cara uji Kapang & khamir sesuai Lampiran A.7.7

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji puree buah

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh puree buah dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh puree buah dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh puree buah dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "khas, normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “khas, normal”; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati warna contoh uji; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan “khas, normal”; dan
- b) jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.3 Padatan terlarut

A.3.1 Prinsip

Indeks bias larutan contoh diukur pada suhu $(20 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ menggunakan refraktometer. Nilai indeks bias setara dengan jumlah padatan terlarut (dihitung sebagai konsentrasi sukrosa) menggunakan tabel, atau langsung dibaca pada refraktometer yang mempunyai skala nilai padatan terlarut.

A.3.2 Pereaksi

- a) Air
Air yang digunakan harus disuling dua kali dalam gelas borosilikat, atau yang setara dengan kemurniannya.

A.3.3 Peralatan

- a) Refraktometer;
Dapat menggunakan salah satu dari alat berikut ini:
 - a.1 Refraktometer yang menunjukkan indeks bias dengan skala 0,001 agar mampu membaca hingga kira-kira 0,000 2. Refraktometer ini diatur agar indeks bias pada suhu $20 ^\circ\text{C} \pm 0,5 ^\circ\text{C}$ untuk air suling menunjukkan nilai 1,333 0
 - a.2 Refraktometer yang menunjukkan nilai sukrosa dengan skala 0,10%. Refraktometer ini diatur agar nilai padatan terlarut (sukrosa) air suling menunjukkan nilai 0.

- b) Alat untuk sirkulasi air, alat ini berguna untuk mempertahankan suhu pada prisma refraktometer tetap stabil sekitar $\pm 0,5$ °C agar nilai perbedaan suhu selain 20 °C dapat dihitung menggunakan tabel koreksi; dan
- c) Gelas piala 250 mL.

A.3.4 Cara kerja

- a) Timbang dengan teliti hingga 40 g contoh ke dalam gelas piala dan tambahkan 100 mL sampai 150 mL air. Panaskan hingga mendidih selama 2 menit sampai 3 menit, aduk dan dinginkan. Biarkan 20 menit lalu timbang dan saring;
- b) Pastikan peralatan telah disiapkan dan diteliti menurut buku panduan alat dan bersihkan permukaan prisma lalu keringkan;
- c) Alirkan air pengontrol untuk mendapatkan suhu yang diharapkan (antara 15 °C sampai dengan 25 °C), biarkan air mengalir melalui mantel prisma refraktometer pada jangka waktu tertentu supaya terjadi keseimbangan suhu ± 5 °C (prisma dalam keadaan tertutup);
- d) Pindahkan satu tetes air ke prisma refraktometer untuk menentukan titik nol atau digunakan sebagai koreksi;
- e) Ambil larutan contoh dan atur suhu yang diinginkan. Teteskan (2 sampai dengan 3 tetes) larutan contoh ke dalam prisma refraktometer, buat larutan menyebar ke permukaan prisma dan segera atur tombol untuk mengatur prisma. Penggunaan lampu uap natrium akan mendapatkan hasil yang lebih tepat (khususnya untuk produk yang berwarna/gelap);
- f) Baca refraktometer sesuai petunjuk buku panduan alat;
- g) Gunakan beberapa skala koreksi untuk mendapatkan pembacaan terkoreksi.

Catatan: Apabila dikerjakan pada suhu selain 20 °C maka pembacaan harus dikoreksi dengan tabel koreksi pada Tabel A.1

A.3.5 Penyajian hasil uji

Koreksi

Jika dibaca pada suhu selain dari 20 °C $\pm 0,5$ °C maka koreksinya menggunakan rumus sebagai berikut:

- a) Untuk refraktometer yang menggunakan skala indeks bias menggunakan rumus:

$$n_D^{20} = n_D^t + 0,0013(t - 20)$$

Dengan:

n_D^{20} adalah indeks bias pada suhu 20 °C;

n_D^t adalah indeks bias pada suhu pengukuran;

t adalah suhu dalam °C

- b) Untuk refraktometer yang menggunakan skala % sukrosa, koreksi hasil dengan menggunakan Tabel A.1

A.3.6 Perhitungan

- a) Refraktometer dengan skala indeks bias:
Baca padatan terlarut dari Tabel A.2, koreksi jika perlu

$$\% \text{ padatan terlarut} = \frac{(P \times m_1)}{m_0}$$

dengan:

P adalah padatan terlarut yang diencerkan (%);

m_0 adalah bobot contoh sebelum dilarutkan, dinyatakan dalam gram (g);

m_1 adalah bobot contoh setelah dilarutkan, dinyatakan dalam gram (g).

- b) Refraktometer dengan skala nilai sukrosa
Hitung % padatan terlarut (sebagai sukrosa) setara dengan hasil pembacaan pada A.3.7 dan nyatakan hasilnya sampai 1 (satu) desimal

A.3.7 Ketelitian

Perbedaan hasil antara dua penetapan tidak boleh lebih dari 5% untuk produk yang mengandung padatan terlarut lebih besar 0,5%

Tabel A.1 – Koreksi Pembacaan Refraktometer dengan Skala Indikasi Sukrosa untuk Perbedaan Suhu 20 °C ± 0,5 °C

Suhu (°C)	Pembacaan skala untuk padatan terlarut, % (Berdasar massa)									
	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
	Koreksi untuk									
15	0,29	0,31	0,33	0,34	0,34	0,35	0,37	0,38	0,39	0,40
16	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,28	0,30	0,30	0,31	0,32
17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,23	0,23	0,24
18	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,16	0,16
19	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08
	Koreksi untuk ditambah									
21	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
22	0,13	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16
23	0,20	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24
24	0,27	0,28	0,29	0,30	0,30	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32
25	0,35	0,36	0,37	0,38	0,38	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40

Tabel A.2 – Hubungan antara indeks bias dan % padatan terlarut (sukrosa)

Indeks bias	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)
1,3330	0	1,3672	22	1,4076	44	1,4558	66
1,3344	1	1,3689	23	1,4096	45	1,4582	67
1,3359	2	1,3706	24			1,4606	68
1,3373	3	1,373	25	1,4117	46	1,4630	69
1,3388	4			1,4137	47	1,4654	70
1,3403	5	1,3740	26	1,4158	48		
		1,3758	27	1,4179	49	1,4679	71
1,3418	6	1,3775	28	1,4201	50	1,4703	72
1,3433	7	1,3793	29			1,4728	73
1,3448	8	1,3811	30	1,4222	51	1,4753	74
1,3463	9			1,4243	52	1,4778	75
1,3478	10	1,3829	31	1,4265	53		
		1,3847	32	1,4286	54	1,4803	76
1,3494	11	1,3865	33	1,4308	55	1,4829	77
1,3509	12	1,3883	34			1,4854	78
1,3525	13	1,3902	35	1,4330	56	1,4880	79
1,3541	14			1,4352	57	1,4906	80
1,3557	15	1,3920	36	1,4374	58		
		1,3939	37	1,4397	59	1,4933	81
1,3573	16	1,3958	38	1,4419	60	1,4959	82
1,3589	17	1,3978	39			1,4985	83
1,3605	18	1,3997	40	1,4442	61	1,5012	84
1,3622	19			1,4465	62	1,5039	85
1,3638	20	1,4016	41	1,4488	63		
		1,4036	42	1,4511	64		
1,3655	21	1,4056	43	1,4535	65		

A.4 Keasaman

A.4.1 Prinsip

Keasaman dapat dihitung sebagai gr asam/100 mL produk menggunakan faktor konversi sesuai jenis asam sebagai berikut:

- 0,067 untuk asam malat
- 0,045 untuk asam oksalat
- 0,070 untuk asam sitrat monohidrat
- 0,075 untuk asam tartarat
- 0,049 untuk asam sulfurat
- 0,060 untuk asam asetat
- 0,090 untuk asam laktat.

A.4.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Pipet ukur 5 mL dengan ketelitian 0,1 mL, terkalibrasi;
- c) Buret 25 mL dengan ketelitian 0,1 mL, terkalibrasi;
- d) Gelas ukur 250 mL, terkalibrasi;
- e) Gelas piala 250 mL, terkalibrasi; dan
- f) Gelas piala 25 mL

A.4.3 Pereaksi

- a) Aquades;
- b) Alkali.

A.4.4 Cara Kerja

A.4.4.1 Larutan tidak berwarna atau berwarna pucat

- a) Timbang 10 g puree buah, larutkan dengan air mendidih hingga 250 mL;
- b) Titrasi dengan 0,1M alkali, gunakan 0,3 mL phenolptalein untuk setiap 100 mL larutan yang telah dititrasi sehingga terbentuk warna merah muda yang konstan hingga 30 detik

A.4.4.2 Larutan berwarna

- a) Timbang 10 g puree buah, larutkan dengan aquades hingga 250 mL;
- b) Titrasi dengan 0,1M alkali hingga hampir mencapai titik akhir titrasi, gunakan 0,3 mL phenolptalein untuk setiap 100 mL larutan yang telah dititrasi;
- c) Pindahkan 2 sampai dengan 3 mL larutan ke dalam 20 mL aquades dalam gelas piala kecil (pada pengenceran ini warna larutan akan menjadi sangat pucat sehingga warna phenolptalein lebih mudah terlihat);
- d) Bila hasil pengenceran menunjukkan bahwa titik akhir titrasi belum tercapai, tuangkan hasil uji tersebut ke dalam larutan awal, teruskan titrasi hingga mencapai titik akhir titrasi. Dengan membandingkan pengenceran dalam gelas piala kecil, perbedaan yang terbentuk dengan penambahan beberapa tetes 0,1M alkali akan lebih mudah diamati.

A.4.5 Perhitungan

Keasaman (g asam/100 mL puree) = $V \times P$

Keterangan:

V adalah volume 0,1M alkali (mL)

P adalah faktor konversi

A.5 Cemarkan logam

A.5.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.5.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.5.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi retensi partikel 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.5.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 200 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.
- Larutan baku 20 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
- Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.
- Larutan baku 1000 µg/mL Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.

- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

A.5.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh uji (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, kemudian larutkan dengan 10 mL HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

A.5.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.5.2 Timah (Sn)

A.5.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.5.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

A.5.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, KCl 10 mg/mL K; larutkan 1 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Sn; dan larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn.

A.5.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO_3 pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl , dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;

- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $N_2O-C_2H_2$;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu g/mL$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.5.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu g/mL$)
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.5.3 Merkuri (Hg)

A.5.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan $NaBH_4$ atau $SnCl_2$ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.5.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) *Microwave digester*;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) Tabung destruksi;
- g) Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Gelas ukur 25 mL;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- k) Gelas piala 500 ml.

A.5.3.3 Bahan dan Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- b) Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- c) Campuran asam nitrat : asam hidroksi perklorat ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 1:1$);
- d) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- e) Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 %;
- f) Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- h) Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0 025 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.
- l) Batu didih.

A.5.3.4 Cara kerja

A.5.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;

- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.5.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 10 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.5.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.5.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Cemaran arsen (As)

A.6.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.6.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Bunsen Burner*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu berbahan borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 200 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas ukur 25 mL.

A.6.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- l) Larutan baku 100 µg/mL As;
pipet 10 mL larutan baku As 1000 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 µg/mL As.
- m) Larutan baku 1 µg/mL As; dan
pipet 1 mL larutan baku As 100 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 µg/mL As.
- n) Larutan baku kerja As.
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 µg/mL As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL dan 0,05 µg/mL As.

A.6.4 Cara kerja

A.6.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO₃ pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H₂SO₄ pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO₃ pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO₄ 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO₄, tambahkan lagi sedikit HNO₃ pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H₂O dan 5 mL (NH₄)₂C₂O₄ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO₃ di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH₄) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.6.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan Mg(NO₃)₂, Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu (450 °C) (± 1 jam);

- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan Bunsen burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Cemarkan mikroba

A.7.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Kapang dan Khamir

A.7.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.7.1.2 Peralatan

- a) Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- b) Otoklaf;
- c) Neraca analitik kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- d) Pemanas listrik;
- e) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- f) Gelas piala steril;
- g) Erlenmeyer steril;

- h) Botol pengencer steril;
- i) Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- j) Tabung reaksi; dan
- k) Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.7.1.3 Larutan pengencer untuk Uji *E. coli* dan *S. Aureus*

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- Air suling 500 mL

Larutkan bahan-bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL, kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.7.1.4 Larutan pengencer untuk Angka Lempeng Total

Buffered peptone water (BPW)

- Peptone 10 g
- Natrium klorida 5 g
- Disodium hidrogen fosfat 3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat 1,5 g
- Air suling 1 L

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.7.1.5 Larutan pengencer untuk Kapang dan Khamir

Peptone 0,1%

- Peptone 1 g
- Air suling 1 L

Larutkan bahan-bahan dalam 1 L air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 mL atau 450 mL ke dalam botol (labu) 500 mL dan 9 mL ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu 121 °C selama 20 menit.

A.7.1.6 Homogenisasi contoh untuk *E.coli* dan *S.aureus*

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.7.1.7 Homogenisasi contoh untuk ALT

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.7.1.8 Homogenisasi contoh untuk Kapang dan Khamir

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.7.2 Angka lempeng total

A.7.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.7.2.2 Peralatan

- Inkubator $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 ml terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 ml dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

A.7.2.3 Pembenihan dan pengencer

- Buffered peptone water* (BPW)

– Peptone	10 g
– Natrium klorida	5 g
– Disodium hidrogen fosfat	3,5 g
– Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
– Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

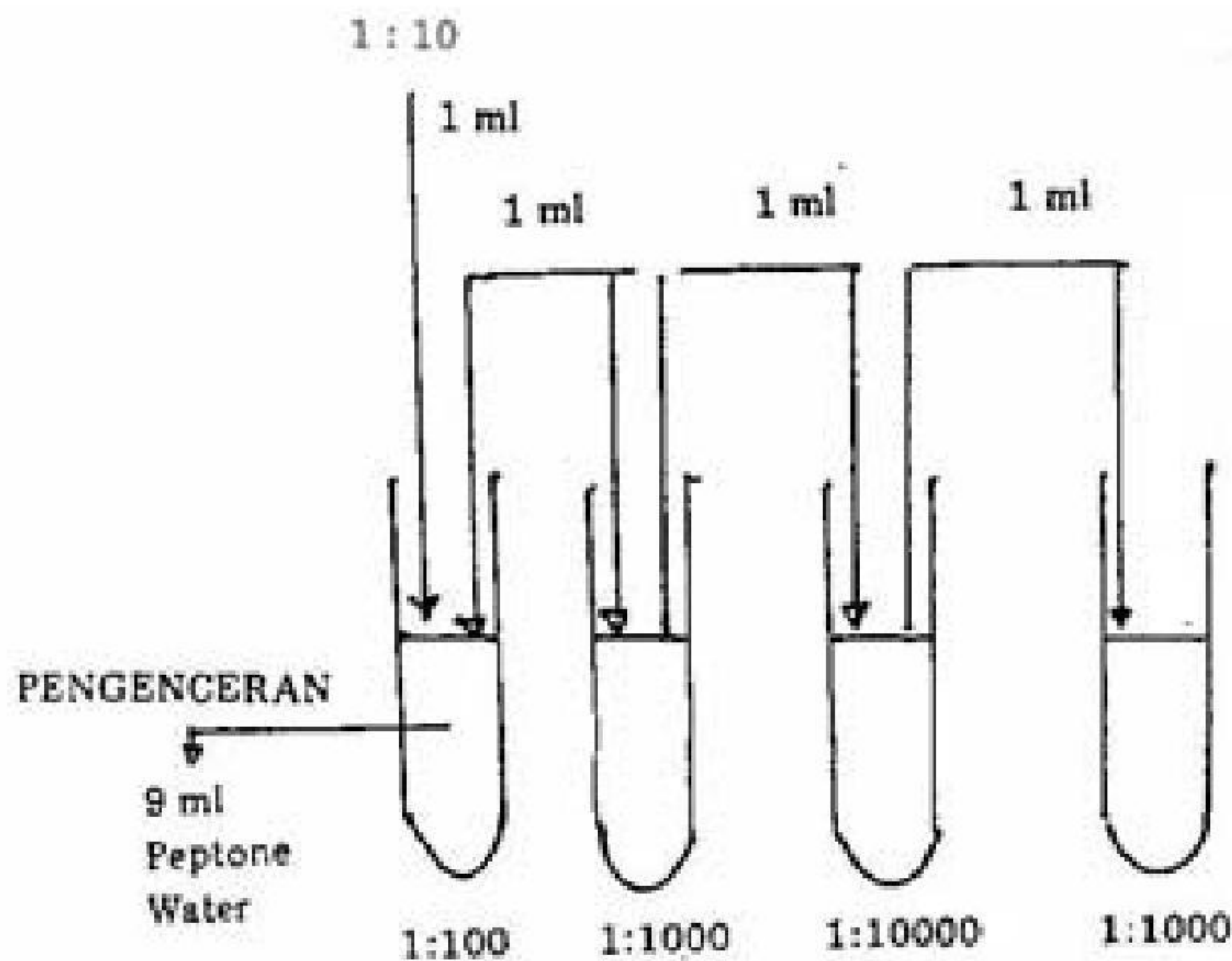
- Plate count agar* (PCA)

– <i>Yeast extract</i>	2,5 g
– <i>Pancreatic digest of caseine</i>	5 g
– Glukosa	1 g
– Agar	15 sampai dengan 20 g
– Air suling	1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

A.7.2.4 Cara kerja

- Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.



Gambar A.1 – Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW).

- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^1 - 10^5 ke dalam cawan Petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
- Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama 72 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 48 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

A.7.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.7.2.6 Pernyataan hasil

A.7.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;
- n_1 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
- n_2 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;
- d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
 - jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm ²)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000$ (6.5×10^6)
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000$ (5.9×10^6)

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.7.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
- bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.7.3 Bakteri *Coliform*

A.7.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Coliform* setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C, kemudian dilakukan uji penegasan menggunakan tabung BGLB *broth*.

A.7.3.2 Peralatan

1. Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
2. Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi bulb dan pipettor; dan
3. Cawan Petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.7.3.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *Violet red bile agar* (VRBA);
- | | | |
|-------------------------------|-------|----|
| - yeast extract | 3 | g |
| - pepton atau <i>gelysate</i> | 7 | g |
| - sodium klorida | 5 | g |
| - garam <i>bile</i> no.3 | 1,5 | g |
| - laktosa | 10 | g |
| - <i>neutral red</i> | 0,03 | g |
| - <i>crystal violet</i> | 0,002 | g |
| - agar | 15 | g |
| - air suling | 1 000 | mL |

Masukkan bahan-bahan di atas ke dalam 1 000 mL air suling, panaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Sterilkan pada suhu 121 °C, selama 5 menit dan tepatkan pH akhir (7,4±0,2).

- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* 2%; dan
c) *tryptic soy agar*.

A.7.3.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.7.1;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} ke dalam cawan Petri dan tuang dengan 10 mL VRBA bersuhu 48 °C, kemudian goyang cawan untuk meratakan. Biarkan memadat, kemudian tuang lagi dengan 5 mL VRBA, dinginkan dan biarkan memadat. Lakukan duplo;
- jika pengkayaan diperlukan, tuangkan 8 mL sampai dengan 10 mL *tryptic soy agar* sebagai lapisan dasar dan kondisikan suhu 48 °C. Goyang cawan hingga agar rata kemudian inkubasi pada suhu ruang selama (2 ± 0,5) jam. Kemudian lapisi dengan 8 mL sampai dengan 10 mL VRBA cair kemudian diamkan hingga membeku dan memadat;
- balikkan cawan dan inkubasikan pada 18 jam sampai dengan 24 jam pada 35 °C;
- amati cawan di bawah penyorotan kaca pembesar. Hitung koloni warna ungu kemerahan yang berdiameter 0,5 mm atau lebih besar dan dikelilingi oleh gumpalan asam *bile*. Koloni cawan harus berjumlah sekitar 25 koloni sampai dengan 250 koloni. Kemudian dilanjutkan dengan uji penegasan untuk koloni yang positif;
- uji penegasan dilakukan dengan memindahkan sedikitnya 10 mata ose koloni yang mewakili, pindahkan masing-masing koloni ke dalam tabung BGLB *broth*;
- inkubasikan tabung pada 35 °C. Amati setelah 24 sampai dengan 48 jam terhadap terbentuknya gas; dan
- tabung yang menghasilkan gas dianggap sebagai positif *Coliform*.

A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Coliform (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F$$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g) yang diduga sebagai *Coliform*;
- a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *Coliform* (ditunjukkan dengan pembentukan gas pada tabung BGLB);
- b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang diduga sebagai *Coliform*;
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.7.3.6 Pernyataan Hasil

A.7.3.6.1 Cara Menghitung

Hitung koloni *Coliform* sesuai dengan A.7.2.6.1.

A.7.3.6.2 Cara Membulatkan Angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan *Coliform* sesuai dengan A.7.2.6.2.

A.7.4 *Escherichia coli*

A.7.4.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.7.4.2 Peralatan

- a) Inkubator, $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- a) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- b) Rak untuk tabung reaksi;
- c) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril, berskala;
- d) Botol pengencer, terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- e) Tabung reaksi dan Tabung *Durham*;
- f) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- g) Jarum Ose dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.7.4.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2%;
- c) *Escherichia coli (EC) broth*;
- d) *Agar Levine's eosin methylene blue (L-EMB)*;
- e) *Plate count agar (PCA)*;
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *Pereaksi Kovacs'*;
- i) *Methyl red – Voges Proskauer (MR – VP) broth*;
- j) *Pereaksi Voges Proskauer*;
- k) Larutan merah metil;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents* 0,1%;
- n) *Pereaksi indol*;
- o) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- p) *Butterfield's Phosfat Buffered Dilution Water (BPB)*;
- q) Larutan alfa naftol 5%; dan
- r) Kristal kreatin.

A.7.4.4 Cara kerja

A.7.4.4.1 APM - Uji pendugaan untuk *E.coli*

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.7.1;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.7.4.4.2 APM - Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- inkubasikan tabung-tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2)\text{ }^{\circ}\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif";
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif"; dan
- lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.7.4.4.3 Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- goreskan/tanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm;
- inkubasikan pinggan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga *E. coli* pada tabung agar miring PCA;
- inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya; dan
- buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti di bawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas:
 - uji indol
 - Inokulasi tabung *tryptone (tryptophane) broth*;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *Kovacs*'; dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.

- uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5% dalam alkohol dan 0,2 ml larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin; dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
- uji merah metil
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.
- uji sitrat
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35°C ; dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
- uji pembentukan gas dari laktosa
 - Inokulasi tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
 - amati tabung - tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.7.4.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 – Reaksi biokimia *Escherichia coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varietas I	+	+	-	-
Varietas II	-	+	-	-

- a) Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila:
 - Uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.2.;
 - pewarnaan gram menunjukkan gram negative bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam LST broth dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C .
- b) Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung
 - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 – APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	< 3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

A.7.5 *Salmonella* sp.

A.7.5.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.7.5.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 2) °C;
- Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* (4 ± 2) °C;
- Otoklaf;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik, kapasitas 2 000 g, terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Neraca analitik, kapasitas 120 g, terkalibrasi dengan ketelitian 5 mg;
- Penangas air, (49 ± 1) °C;

- h) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, Erlenmeyer 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan Petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.7.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Buffered peptone water (BPW)*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) Media *Rappaport-Vassiliadis (RV)* (media RV harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) *Agar Xylose lysine desoxycholate (XLD)* (agar XLD);
- e) *Agar Hektoen enteric (HE)*;
- f) *Agar Bismuth sulfite (BS)*;
- g) *Agar Triple sugar iron (TSI)*;
- h) *Tryptone (atau tryptophane) broth (TB)*;
- i) *Trypticase soy-tryptose broth (TSTB)*;
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) broth*
- k) *Agar Simmons citrate*;
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar (LIA)* (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth (LDB)*;
- q) *Potassium cyanide (KCN) broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth (Phenol red lactose broth dan Phenol red red sucrose broth)* atau *Purple carbohydrate broth (Purple lactose broth dan Purple sucrose broth)*;
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*;
- t) *Agar MacConkey*;
- u) *Brain heart infusion (BHI) broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) Pereaksi Kovacs';
- x) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- y) Kristal kreatin fosfat;

- z) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40 %;
- aa) Larutan *bromocresol purple dye*, 0,2 %;
- bb) Indikator merah metil;
- cc) Indikator *phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) Air suling steril;
- ee) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ff) Larutan *formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) Alfa naftol;
- ii) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- gg) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- kk) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*; dan
- ll) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.7.5.4 Cara Kerja

A.7.5.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) *Buffered peptone water* diinokulasi pada suhu kamar kemudian diinkubasi pada $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama 18 jam \pm 2 jam;
- b) Untuk sampel dengan jumlah banyak, *buffered peptone water* dipanaskan dahulu hingga mencapai $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

A.7.5.4.2 Pengkayaan

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media Rappaport-Vassiliadis (RV) dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate (TT) broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam dalam penangas air bersirkulasi dan *TT broth* pada $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam.

A.7.5.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan *TT broth* ke dalam cawan Petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
 XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.
 Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
 HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.
 Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.
 Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula

coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- f) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu ($5 - 8$) °C;
- g) inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA biakan *Salmonella* sp. Akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada tabung agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk H₂S pada agar miring LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, serta reaksi asam pada tusukannya di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp.. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada bagian miring dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga dari media selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media agar selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV; dan
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media agar selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.7.5.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

A.7.5.5.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media agar *MacConkey*, HE atau XLD *broth*. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu :
 - agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - agar *hektoen enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam; dan

- agar *xylose lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.11.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.11.4.4.3.g.

A.7.5.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang tidak diinokulasikan biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung *urea broth* tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) Uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose berdiameter 3 mm ke dalam tabung *rapid urea Broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Biarkan *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.

A.7.5.5.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) *broth*;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDA. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
 - *Potassium cyanide* (KCN) *broth*
Pindahkan 1 Ose biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan bila perlu dilapisi dengan parafin atau film. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
 - *Malonate broth*
Pindahkan 1 mata Ose dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- Uji indol

Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL biakan ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.7.5.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- Inokulasi dari masing-masing agar TSI yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *Trypticase soy tryptose* (TST) *broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL biakan di atas.
- siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan ± 0,5 mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam, sebagai berikut:
 - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.7.5.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.7.5.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 butir 1-11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.7.4.5.1 diatas dan uji kembali, sesuai dengan A.7.4.5.2 Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - inokulasi *broth* ini dengan biakan agar TSI miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;

Ikuti prosedur sesuai dengan A.7.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*; dan

Inokulasi media dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

 - Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 mL alfa naftol dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

 - Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Agar Simmons citrate*.
 - Inokulasi media dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari agar miring TSI, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif; dan
 - negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.7.5.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.7.4.5.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 – Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	tidak hitam	+
4.	<i>Urease</i>	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	<i>KCN broth</i>	Pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji <i>indol</i>	permukaan bewarna violet	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji <i>polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji <i>polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:

^a+ adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari;

- adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;

V adalah variabel;

^b adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: negatif; dan

^c adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.4 – Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indol</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji <i>indol</i> dan uji Spicer Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna violet) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna violet) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	<i>KCN broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		

A.7.6 *Staphylococcus aureus*

A.7.6.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulasi.

A.7.6.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering, terkalibrasi;
- Spreader* steril dari gelas;
- Botol pengencer 500 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL;
- Tabung reaksi;
- Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Jarum Ose.

A.7.6.3 Pembenihan dan pereaksi

- Baird-parker agar* (BPA);
- Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- Plasma koagulase (dari kelinci).

A.7.6.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.7.1;
- pipet 1 ml larutan contoh ke dalam 3 cawan Petri berisi media BPA (misalkan 1 mL dibagi menjadi 0,3 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL larutan contoh);
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh media (± 10 menit). Jika contoh

tidak mudah terserap oleh media, tempatkan cawan Petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan Petri dibalik;

- d) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- e) pilih cawan Petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.7.6.5 Uji koagulasi

- a) Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL BHIB;
- b) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- c) tambahkan plasma koagulase kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam biakan BHIB dan campur;
- d) inkubasikan campuran plasma koagulase kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam, kemudian amati terbentuknya penggumpalan setiap 6 jam. *Staphylococcus aureus* positif apabila terbentuk gumpalan yang kokoh dan utuh serta dapat bertahan dalam tabung ketika dibalikkan;
- e) amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- f) ratakan koloni (n) dari ketiga cawan Petri yang diwakili oleh koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengenceranya (F); dan
- g) hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g contoh.

A.7.6.6 Perhitungan

$$\text{Staphylococcus aureus (koloni/g)} = n \times F$$

Keterangan:

n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g); dan
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.7.7 Kapang dan khamir

A.7.7.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari.

A.7.7.2 Peralatan

- a) Inkubator (25 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Otoklaf;
- c) Penangas air (45 ± 1) °C;
- d) pH meter
- e) Alat penghitung koloni;
- f) *Tally register*;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL;
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 100 mm), steril; dan
- i) *Bent glass rod*.

A.7.7.3 Pembenihan, pengencer, dan pereaksi

- a) Agar *Dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- b) Agar *Dichloran 18% glycerol* (DG 18);
- c) Larutan pepton 0,1 %; dan

- Pepton 1 g
- Air suling 1 000 mL

Larutkan pepton dalam air suling, kemudian sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, dan atur pH sehingga mencapai pH akhir ($7,0 \pm 0,2$).

- d) Larutan antibiotik.

Antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil selama proses dalam otoklaf. Konsentrasi antibiotik yang dianjurkan adalah 100 mg/L media. Jika terlihat pertumbuhan bakteri yang berlebihan, siapkan media dengan penambahan *chloramphenicol* 50 mg/L sebelum otoklaf dan *chlortetracycline* 50 mg/L steril saat media mulai dikondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.7.7.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-3} , dengan menggunakan larutan pepton 0,1 %;
- c) Persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu:
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai a_w kurang dari 0,95 :
pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media dan sebar merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18):
 - Pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan Petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan Petri memadat.
- d) masukkan semua cawan Petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- e) hitung koloni pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora; dan
- f) nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

A.7.7.5 Pernyataan hasil

Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni - 150 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang per g.

Keterangan:

- (1) Koloni kapang biasanya buram dan berbulu.
- (2) Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).

- (3) Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang



Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 942.15, Acidity (Titratable) of Fruit Products*, 18th Edition, Chapter 37.1.37.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 1998. *Mold, Yeast, and Mycotoxin. 8th edition. Chapter 18*.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- International Standards ISO 6579:2002 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella sp.*
- International Standards ISO 2173:2003. Fruit and Vegetable Products – Determination of Soluble Solids – Refractometric Method.*
- International Standards ISO 4833:2003 (E). Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Tehnique at 30 °C.*
- SNI 7387 : 2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*
- SNI 7388 : 2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*